

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-247980
(43)Date of publication of application : 03.09.2002

(51)Int.Cl.

C12N 7/00

(21)Application number : 2001-049988
(22)Date of filing : 26.02.2001

(71)Applicant : JSR CORP
(72)Inventor : MURATA MITSUHIRO
KATAYOSE SATOSHI
OZAKI ICHIRO
HIKATA MIKIO
SATOU KOUEI
YAMAGUCHI TERUHIDE

(54) METHOD FOR SELECTIVELY SEPARATING ENVELOPE VIRUS AND NON-ENVELOPE VIRUS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for selectively separating envelope virus and non-envelope virus from a sample.
SOLUTION: This method for selectively separating envelope virus and non-envelope virus is characterized by comprising (1) the step of separating the envelope virus by adding a virus-binding carrier I bearing cationic groups at least on the surface thereof to a virus-containing sample followed by separating the carrier I from the sample, and (2) the step of adding a virus-binding carrier II bearing anionic groups at least on the surface thereof and then separating the carrier II from the sample.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

This Page Blank (uspto)

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-247980

(P2002-247980A)

(43)公開日 平成14年9月3日(2002.9.3)

(51)Int.Cl.

C 12 N 7/00

識別記号

F I

C 12 N 7/00

マークト(参考)

4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数1 OL (全 8 頁)

(21)出願番号 特願2001-49988(P2001-49988)

(22)出願日 平成13年2月26日(2001.2.26)

(71)出願人 000004178

ジェイエスアール株式会社

東京都中央区築地2丁目11番24号

(72)発明者 村田 充弘

東京都中央区築地二丁目11番24号ジェイエスアール株式会社内

(72)発明者 片寄 聰

東京都中央区築地二丁目11番24号ジェイエスアール株式会社内

(72)発明者 尾崎 一郎

東京都中央区築地二丁目11番24号ジェイエスアール株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エンベロープウイルスと非エンベロープウイルスの選択的分離方法

(57)【要約】

【課題】 本発明は、エンベロープウイルスと非エンベロープウイルスを試料から選択的に分離する方法を得る。

【解決手段】 1. カチオン性基を少なくともその表面に持つウイルス結合性担体Iをウイルス含有試料に添加した後、ウイルス結合性担体Iを試料から分離することによりエンベロープウイルスを分離する工程および2. アニオン性基を少なくともその表面に持つウイルス結合性担体IIを添加した後、ウイルス結合性担体IIを試料から分離する工程を含むことを特徴とするエンベロープウイルスと非エンベロープウイルスの選択的分離方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 1. カチオン性基を少なくともその表面に持つウイルス結合性担体Iをウイルス含有試料に添加した後、ウイルス結合性担体Iを試料から分離することによりエンベロープウイルスを分離する工程および
2. アニオン性基を少なくともその表面に持つウイルス結合性担体IIを添加した後、ウイルス結合性担体IIを試料から分離することにより非エンベロープウイルスを分離する工程を含むことを特徴とするエンベロープウイルスと非エンベロープウイルスの選択的分離方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、エンベロープウイルスと非エンベロープウイルスを試料から選択的に分離する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ウイルスは、中心部に核酸あるいはコアと呼ばれる核タンパク質複合体を持ち、その回りにキャップシドと呼ばれるタンパク質構造がある。さらに一部のウイルスでは、キャップシドが感染細胞から放出される際に、キャップシドが細胞膜由来の脂質二重層に覆われる。前者は非エンベロープウイルス (Naked Virus)、後者はエンベロープウイルス (Enveloped Virus) と呼ばれている。従来、エンベロープウイルスと非エンベロープウイルスを分離するためには、密度勾配超遠心法などの比重を利用した方法が用いられていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかし密度勾配超遠心法は、高価な機器や多大な処理時間、熟練した技術が必要であり、一度に処理できるウイルス量も限られる。また、両ウイルスタイプで比較的比重差の少ないウイルス種があり、完全な方法とは言い難い。そこで、エンベロープウイルスと非エンベロープウイルスを簡便な方法で選択的に分離できる方法が望まれている。本発明は、上記の密度勾配超遠心法の欠点を改善し、エンベロープウイルスと非エンベロープウイルスの簡便な分離と、短時間での大量処理が可能な方法を提供することを目的とする。

【0004】

【発明を解決するための手段】本発明は、1. カチオン性基を少なくともその表面に持つウイルス結合性担体Iをウイルス含有試料に添加した後、ウイルス結合性担体Iを試料から分離することによりエンベロープウイルスを分離する工程および
2. アニオン性基を少なくともその表面に持つウイルス結合性担体IIを添加した後、ウイルス結合性担体IIを試料から分離することにより非エンベロープウイルスを分離する工程を含むことを特徴とするエンベロープウイルスと非エンベロープウイルスの選択的分離方法を提供するものである。

【0005】

【発明の実施の形態】以下、本発明を具体的により詳しく説明する。

【ウイルス含有試料】本発明を適用できるウイルス含有試料とは、ウイルスを含有している可能性のある血清、尿、唾液、組織の溶解液、培養細胞破碎液、培養液などである。ウイルスは上記試料中に含まれている自然状態であっても良いし、または、超遠心分離等の前処理により、共存する蛋白、脂質、糖等の夾雑物を除去した状態であっても良い。本発明において、エンベロープウイルスとしては、ボックスウイルス（以後「ウイルス」は省略）、ヘルペス、トガ、コロナ、パラミクソ、オルトミクソ、ラブド、ブニヤ、アレナ、レトロ、バキュロなどを、非エンベロープウイルスとしては、イリド、アデノ、パボーバ、パルボ、レオ、ピコルナ、カリシ、ノダなどを挙げることができる。

【0006】【ウイルス結合性担体】

（1）担体I

カチオン性基を少なくともその表面に持つ担体Iとしては、その表面に、アミノ基、アンモニウム基、イミノ基、イミジノ基、ヒドラジノ基、さらにビリジル基等の窒素原子を含む環状基等を持つ担体を挙げることができる。これら担体Iのカチオン性基は、アミノ基等のプロトンと結合してカチオンを形成し得る基および該基が酸と反応して塩を生成し、塩のカチオン部を形成している基を包含する。担体Iとして表面がカチオン性を有するものとしては、例えば、担体Iが①カチオン性基を有するモノマーを共重合した重合体からなるもの、②カチオン性基を有する重合開始剤を用いてラジカル重合させて得た重合体からなるもの、③カチオン性基を有する化合物を重合体担体に結合してなるもの、④陰イオン交換樹脂からなるもの、⑤カチオン性基含有水溶性高分子を水不溶性ポリマー担体に担持させたもの、⑥無機ポリマーまたは無機粒子の表面に、カチオン性基を有する重合体またはカチオン性基含有水溶性高分子を有するものなどである。

【0007】上記の例としては、次のものを挙げることができる。

①カチオン性基を有するモノマーを共重合した重合の例：カチオン性基を有するモノマーとしては、2-ジメチルアミノエチル（メタ）アクリレート、2-ジエチルアミノエチル（メタ）アクリレート、2-ジメチルアミノプロピル（メタ）アクリレート、3-ジメチルアミノプロピル（メタ）アクリレート等のアミノアルキル基含有（メタ）アクリル酸エステル類及びこれらの塩化メチレン、硫酸ジメチル、硫酸ジエチル等による4級塩；2-（ジメチルアミノエトキシ）エチル（メタ）アクリレート、2-（ジエチルアミノエトキシ）エチル（メタ）アクリレート、3-（ジメチルアミノエトキシ）プロピル（メタ）アクリレート等のアミノアルコキシアルキル

基含有(メタ)アクリル酸エステル類及びこれらの塩化メチレン、硫酸ジメチル、硫酸ジエチル等による4級塩: N-(2-ジメチルアミノエチル)(メタ)アクリルアミド、N-(2-ジエチルアミノエチル)(メタ)アクリルアミド、N-(2-ジメチルアミノプロピル)(メタ)アクリルアミド、N-(3-ジメチルアミノプロピル)(メタ)アクリルアミド等のN-アミノアルキル基含有(メタ)アクリルアミド類及びこれらの塩化メチレン、硫酸ジメチル、硫酸ジエチル等による4級塩等が挙げられる。なかでも、2-ジメチルアミノエチル(メタ)アクリレート、N-(2-ジメチルアミノエチル)(メタ)アクリルアミド、及びこれらの塩化メチレンによる4級塩が好ましい。これらは、他の重合性モノマーと共に重合させてもよい。カチオン性モノマーと共に重合するモノマーとしては、下記に示すような架橋性モノマーならびに非架橋かつ非イオン性モノマーを挙げることができる。架橋性モノマーとしては、ジビニルベンゼン、ジビニルビフェニル、エチレングリコールジ(メタ)アクリレート、ジエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、トリエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、テトラエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、プロピレングリコールジ(メタ)アクリレート、ジプロピレングリコールジ(メタ)アクリレート、トリプロピレングリコールジ(メタ)アクリレート、テトラプロピレングリコールジ(メタ)アクリレート、1,4-ブタンジオールジ(メタ)アクリレート、1,6-ヘキサンジオールジ(メタ)アクリレート、ネオペンチルグリコールジ(メタ)アクリレート、2,2'-ビス[4-(メタ)アクリロイルオキシプロピオキシフェニル]プロパン、2,2'-ビス[4-(メタ)アクリロイルオキシジエトキジフェニル]プロパン、グリセリントリ(メタ)アクリレート、トリメチロールプロパントリ(メタ)アクリレート、ベンタエリスリトールテトラ(メタ)アクリレート等のジビニル系モノマー、トリビニル系モノマー及びテトラビニル系モノマーが挙げられる。なかでも、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメタクリレートおよびトリメチロールプロパントリメタクリレートが好ましい。

【0008】共重合可能な非架橋性かつ非イオン性モノマーは、カチオン性モノマーあるいは架橋性モノマーのいずれかと共に重合可能であって、非架橋性かつ非イオン性のモノマーである。このようなモノマーとして、スチレン、 α -メチルスチレン、p-メチルスチレン、ハロゲン化スチレン等の芳香族ビニル単量体；アクリロニトリル等の不飽和ニトリル；メチルアクリレート、メチルメタクリレート、エチルアクリレート、エチルメタクリレート、ブチルアクリレート、ブチルメタクリレート、シクロヘキシルメタクリレート、2-エチルヘキシルアクリレート、2-エチルヘキシルメタクリレート、ラウリルアクリレート、ラウリルメタクリレート、グリシジ

ルアクリレート、グリシジルメタクリレート、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレート等のアクリル酸エステルおよびメタクリル酸エステル；ブタジエン、イソブレン等のジオレフィン；酢酸ビニル等のカルボン酸ビニルエステル；塩化ビニル、塩化ビニリデン等のハロゲン化ビニリデン等を挙げることができる。なかでも、スチレン、 α -メチルスチレン、アクリロニトリル、メチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、2-ヒドロキシエチルアクリレート、シクロヘキシルメタクリレートが好ましい。

【0009】②カチオン性基を有する重合開始剤を使用してモノマーを重合して得た重合体の例：カチオン性基を有するラジカル重合開始剤は、これを用いたラジカル重合により得られたポリマーがその末端に該ラジカル重合開始剤に由来するカチオン性基を有するようになるものである。好ましいカチオン性基を有するラジカル重合開始剤としては、アミジノ基、イミジノ基あるいはビリジウム基を有するアゾビス型の開始剤が挙げられる。また、10時間半減期温度が40～95°Cの範囲にあるものが温和な条件下で重合を行うことができるので好ましい。

③カチオン性基を有する化合物を重合体担体に結合させてなる重合体

粒子表面にカルボキシル基、ハイドロキシル基、エポキシ基、アミノ基、アミド基などを共重合やシード重合法などにより導入し、それらの基を結合部として反応させることにより、カチオン性基を有する化合物を重合体表面に導入することができる。カチオン性基を有する化合物としては、ポリエチレンイミン、ポリプロピレンイミン、ポリアリルアミン、ポリビニルアミン、ポリプロピレンアミンなどのポリアミン化合物、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリヒスチジンなどの遊離アミノ酸類、前述のカチオン性基を有するモノマーを共重合したポリマーなどを挙げることができる。

【0010】④陰イオン交換樹脂

ジビニルベンゼン架橋ポリスチレンに第4級アンモニウム基- $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ (I型)あるいは- $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3(\text{C}_2\text{H}_4\text{OH})$ (II型)を導入した強塩基性陰イオン交換樹脂、-NH(CH_3)₂、-NH($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$)_nH、-CONH(CH_2)₃N(CH_3)₂を導入した弱塩基性陰イオンなど。

⑤無機ポリマーまたは無機化合物の表面にカチオン性基を有する重合体またはカチオン性基含有水溶性高分子を有するもの。さらにキレート樹脂といわれる供与体原子(O, N, S)を有する樹脂も挙げることができる。キレート樹脂としては、イミノ二酢酸型、イミノプロピオニ酸型、エチレンジアミン三酢酸型、キノリン型、アミノカルボン酸型、アミンリン酸型、アミドキシム型、クリプタント型、ポリアミン型、ピリジン型、ピコリルアミン型、チオール型、リン酸型、多価フェノール型、ジチオカルバミン酸型、チオ尿素型、イソチウロニウム型

およびジチゾン型などが挙げられる。

【0011】(2) 担体II

アニオン性基としては、カルボキシル基、スルホン基（スルホン基は硫酸基の一部として存在していてもよい）、リン酸基などを挙げることができる。これらのアニオン性基は塩を形成した状態で存在してもよい。担体IIとしてアニオン性を有するものとしては、例えば、担体IIが①アニオン性基を有するモノマーを共重合した重合体からなるもの、②重合体をアニオン化してなるもの、③合成高分子にスルホン酸含有单量体をシード結合又はグラフト重合してなる重合体、④陽イオン交換樹脂からなるもの、⑤硫酸化した天然高分子を水不溶性ポリマー担体に担持させたもの、⑥無機ポリマーまたは無機粒子の表面に、アニオン性基を有する重合体または硫酸化した天然高分子を有するもの、などである。上記の例として次のものを挙げることができる。

【0012】①アニオン性基を有するモノマーを共重合した重合体の例：カルボン酸含有单量体の（共）重合体をあげることができる。ここで、カルボン酸含有单量体（以下「カルボン酸单量体」という。）とは、付加重合性の不飽和結合およびカルボキシル基を分子中に有する重合性单量体である。具体例としては、アクリル酸、メタクリル酸、クロトン酸、イタコン酸、フマル酸、マレイイン酸などをあげることができる。

②重合体をアニオン化（スルホン化）してなるものの例：少なくともその表面にスルホン化可能な官能基、例えば主鎖または側鎖に不飽和二重結合、芳香族基、第一級または第二級アミノ基、第一級ハロゲン化アルキル基、脂肪族アルデヒド、脂肪族ケトン、脂肪族カルボン酸、脂肪族カルボン酸無水物、水酸基等をもつ（共）重合体からなり、その表面の少なくとも一部がスルホン化されているもの。表面スルホン化可能な（共）重合体の例として、スチレン、 α -メチルスチレン、ビニルナフタレン、ジビニルベンゼン、ブタジエン、イソブレン、ビニルアルコール等のスルホン化可能な单量体の（共）重合体、およびこれら单量体と他の重合性单量体との（共）重合体等の付加重合系高分子化合物；ポリカーボネット、ポリエステル、ポリエステルエーテル、ポリアリールエーテル、ポリアルキレンオキシド、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリアミド、ポリイミド、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリウレタン、芳香族化合物のアセトアルデヒド縮合物、ポリエーテル等の縮合重合系高分子化合物等があげられる。

【0013】③合成高分子粒子にスルホン酸含有单量体（以下、「スルホン酸单量体」という）および／またはカルボン酸单量体をシード重合あるいはグラフト重合した粒子としては、合成高分子からなるシード粒子にスルホン酸含有单量体および／またはカルボン酸单量体、さらに必要に応じてそれら以外の他の共重合可能な单量体とともにシード（共）重合あるいはグラフト（共）重合

した粒子をあげることができる。このような粒子は、界面活性剤を含む水あるいは水／極性溶媒に分散したシード粒子に、モノマーおよびラジカル発生剤を加え、50～100°Cで反応することにより合成できる。ここで、合成高分子からなるシード粒子としては、スチレン、 α -メチルスチレン、ビニルトルエン、ビニルナフタレンなどの重合性二重結合含有芳香族化合物；アクリロニトリル、メタクリロニトリル、シアノ化ビニリデン等の重合性二重結合含有シアン化合物；ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメタクリレート等の重合性架橋化合物；塩化ビニル、塩化ビニリデン、ビニルメチルエチルケトン、ビニルメチルエーテル、酢酸ビニル、ギ酸ビニル、酢酸アリル、酢酸メタアリル、アクリルアミド、メタクリルアミド、N-メチロールメタクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、アクリル酸グリジル、メタクリル酸グリジル、アクロレイン、メタクロレイン、アリルアルコール、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、2-メトキシエチルアクリレート、n-ブチルアクリレート、sec-ブチルアクリレート、イソブチルアクリレート、t-ブチルアクリレート、n-ブチルメタクリレート、sec-ブチルメタクリレート、イソブチルメタクリレート、t-ブチルメタクリレート、メチルアクリレート、エチルアクリレート、n-アロビルアクリレート、イソアロビルアクリレート、メチルメタクリレート、エチルメタクリレート、n-アロビルメタクリレート、イソアロビルメタクリレート等の重合性二重結合含有化合物；エチレンオキシド、プロピレンオキシド、2-メチルテトラヒドロキシフラン、スチレンオキシド、ブチレンオキシド、グリシジルエーテル等の重合性環状化合物等の（共）重合体粒子等をあげることができる。

【0014】スルホン酸单量体としては、イソブレンスルホン酸、エチレンスルホン酸、ビニルスルホン酸、スチレンスルホン酸、 α -メチルスチレンスルホン酸、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸、スルホエチルアクリレート、スルホン化ジシクロペントジエン等をあげることができる。

【0015】他の共重合可能な单量体としては、1,3-ブタジエン、イソブレン等の脂肪族ジエン系化合物；スチレン、 α -メチルスチレン、ビニルトルエンなどの重合性二重結合含有芳香族化合物；メチルアクリレート、エチルアクリレート、2-エチルヘキシルアクリレート、メチルメタクリレート、エチルメタクリレート、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、等の（メタ）アクリル酸アルキルエステル；アクリロニトリル、メタクリロニトリル等の重合性シアン化合物；塩化ビニル、塩化ビニリデン、ビニルメチルエチルケトン、ビニルメチルエーテル、酢酸ビニル、ギ酸ビニル、酢酸アリル、酢酸メタアリル、アクリルアミド、メタクリルアミド、N-メチロールメタクリ

ルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、アクリル酸グリリジル、メタクリル酸グリシジル、アクリレイン、メタクロレイン、アリルアルコール等の重合性二重結合含有化合物、エチレンオキシド、プロピレンオキシド、2-メチルテトラヒドロキシフラン、スチレンオキシド、ブチレンオキシド、グリジルエーテル等の重合性環状化合物等をあげることができる。

【0016】スルホン酸単量体と水溶性架橋性単量体からなるハイドロゲル粒子としては、例えば上記スルホン酸単量体と、N,N'-メチレンビスアクリルアミド等の水溶性架橋性単量体の重合体からなるハイドロゲル粒子を用いることができる。このような粒子は、スルホン酸単量体、水溶性架橋性単量体、ラジカル反応開始剤の水溶液と、界面活性剤を添加した非極性溶媒を激しく混合し、油中水型の逆ミセルを形成させた後、50～100°Cで反応することにより得られる。

【0017】④陽イオン交換樹脂の例としては、ジビニルベンゼン架橋スルホン化ポリスチレンがあげられ、粒径は、中心粒径が0.1mmから1mm程度のもので良い。

⑤硫酸化した天然高分子を水不溶性ポリマー担体に担持させたものの例：硫酸化多糖類としては、ヘパリン、デキストラン硫酸、セルロース硫酸、ガードラン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、デキストラン硫酸、キチン硫酸、キトサン硫酸、デルマタン硫酸、アミロベクチン硫酸、ケタラン硫酸、キシラン硫酸、カラゲニン硫酸、ベクチン硫酸、イヌリン硫酸、アルギン酸硫酸、グリコーゲン硫酸、ポリラクトース硫酸、カラゲニン硫酸、デンプン硫酸、ポリグルコース硫酸、ラミナリン硫酸、ガラクタン硫酸、レバン硫酸、メペサルフェート、フコイダン、硫酸化グリチルリチンなどの抗ウイルス性を有する多糖類を挙げることができる。硫酸化多糖類は、エポキシ基、アミノ基、アルデヒド基、カルボキシル基、水酸基、酸クロライド基などの官能基を持つ重合体に直接もしくはカップリング剤やスペーサーを介して担持させることができる。

【0018】(3) 担体Iおよび担体IIに共通する項目本発明において、ウイルス結合性担体には、分離操作の自動化のために有効な、強磁性体、常磁性体などの磁性体を含有させることができる。ウイルス結合性担体の形状としては特に限定されず種々あり得る。例えば、フィルター状、纖維状(中空纖維も含む)、粒子状、プレート状、チューブ状などである。ウイルス結合性担体の形態が粒子状の場合、粒径はウイルス含有試料中に分散して使用する場合には、0.1～200μm程度、カラムに充填して使用する場合には0.1～1mm程度の粒径を有することが好ましい。フィルターの場合には、好ましくは、平均孔径が0.1～50μmの範囲にあるフィルターであり、平膜、中空糸膜、不織布、織布などを例示できる。血漿や培養液などを対象とした場合は、平均

孔径が0.1μm～10μmが好ましい。平均孔径が0.1μ以下だと、孔径が小さくなるため十分な汎過量が得られなくなる。平均孔径は、ASTM-F316に記載されたバームポロメーター(ポーラスマテリアル社製)を用いて求めた値であり、実際の透過孔を反映する値である。また、フィルターの通水量は、0.7kg/cm²の圧力下で、25°C±2°Cで測定した値で、10mL/min/m²/mmHg以上、好ましくは100mL/min/m²/mmHg以上であることが、汎過圧を低くできるため好ましい。また、不織布状の基材の場合、フィルター材を形成するフィラメントは、モノフィラメントであってもマルチフィラメントであってもよいが、平均直径(走査型電子顕微鏡で観察したフィラメントの長径と短径の平均値)が100μm以下、好ましくは、50μm以下であると、膜の表面積が大きくなり吸着部位が増加することとなるため好ましい。さらに、異形フィラメントであっても多孔質フィラメントであっても良い。さらに、フィルターの空孔部の割合(空孔率)は、20%以上、好ましくは50%以上である。

【0019】ウイルス結合性担体がシート状、チューブ状または板状である例としては、採血管、真空採血管、試験管、ウェルプレート、マイクロプレート、マイクロテストチューブ、エッペンドルフチューブ(商品名)などを挙げることができる。これらの形状のウイルス結合性担体を得るには、上記に例示された有機ポリマーのうちポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ノルボルネン系樹脂などの熱可塑性樹脂はそのまま所望の形状に成形することができる。また、ガラス、ポリスチレン、ポリメチルメタクリートなどからなる汎用の採血管などの表面をイオン化することにより、本発明に適したウイルス結合性担体とすることもできる。また、ガラス、ポリスチレン、ポリメチルメタクリートなどからなる汎用の採血管などの表面をイオン化することにより、本発明に適したウイルス結合性担体とすることもできる。

【0020】[二価イオン]非エンベロープウイルスと担体IIとの結合を促進するため、多価金属イオンを添加することが望ましい。ここで多価金属としては、例えば、Be, Mg, Sr, Ba, Ti, Zr, Cr, Mo, W, Mn, Fe, Ru, Os, Co, Rh, Ni, Pd, Pt, Cu, Ag, Au, Zn, Cd, Hg, Al, Ga, Si, Ge, Sn, Pb, P, As, Sb, Biなどを挙げることができ、多価金属化合物とはこれら多価金属の塩化物、水酸化物、炭酸化合物、硫酸化合物、硝酸化合物、酢酸化合物、塩素酸化合物などのうち、水中で解離して2価以上のカチオンを生成する化合物である。多価金属イオンの使用量は、生体試料中の該イオン濃度が0.01～50mMとなるよう添加する。

【0021】[分離]

(1) エンベロープウイルスの分離

エンベロープウイルスと非エンベロープウイルスの分離

のためには、第一段としてウイルス含有試料を、担体Iと接触させることにより、エンベロープウイルスを分離する。本発明では、ウイルス含有試料と担体Iとの接触方法は種々あり得、特に限定されない。担体Iの形状、大きさなどに応じて適切な方法をとればよい。例えば、担体Iが粒径200μm未満の粒子の場合には、担体Iを試料中に分散させ、場合により振とうすることにより試料と担体Iを接触させる。担体Iが粒径200μmを超える粒子の場合には、カラムに充填し、その中に試料を通過させる。また、担体Iが直径5~6mmのプラスチックビーズなど大きなもの場合は、1~数個を試験管に入れ、試料と接触させる。担体Iがフィルター状または繊維状の場合には、フィルターまたは繊維表面と試料が充分接触するように、フィルターまたは繊維で試料を沪過する。担体Iが試験管やウェルプレートなどの試験器具である場合には、該試験器具の中に試料を入れ振とうする。担体Iにウイルス含有試料を接触させる際のウイルス含有試料の温度は通常0~40°C、接触時間は通常30秒~1時間であるが、ウイルス含有試料の性状により適宜変更することが好ましい。担体Iとウイルス含有試料の接触後、担体Iをウイルス含有試料から取り除くことによりエンベロープウイルスが分離される。この際、担体Iが粒径200μm未満の粒子の場合には、例えば遠心により分離する。また、担体Iに磁性体を含んでおくことにより、ウイルス含有試料から磁気により容易に分離することができる。

【0022】(2) 非エンベロープウイルスの分離
エンベロープウイルスを分離した後のウイルス含有試料は必要に応じて、第二段として非エンベロープウイルス分離工程に移行する。第二段としての非エンベロープウイルス分離工程では、ウイルス含有試料を、担体IIと接触させることにより、非エンベロープウイルスを分離する。この際、非エンベロープウイルスと担体IIとの結合を促進するため、多価金属イオンを添加することが望ましい。本発明では、ウイルス含有試料と担体IIとの接触方法は種々あり得、特に限定されない。担体IIの形状、大きさなどに応じて適切な方法をとればよい。多価金属イオンを添加する以外は、担体IIは上記担体Iと同様な方法で操作することができる。また、エンベロープウイルスの分離や、エンベロープウイルスを除去したウイルス含有試料の取得が目的であれば、必ずしもこの第二段のウイルス分離操作を行う必要はない。また、エンベロープウイルスおよび非エンベロープウイルスを同時に分離したい場合には、ウイルス含有試料を担体IIで直接処理することにより実現できる。

【0023】[ウイルスの回収] 担体Iおよび担体IIに結合して分離されたエンベロープウイルスは、塩溶液を加えて回収し種々の用途に用いること也可能であるし、そのまま核酸を抽出を行い核酸増幅法等の方法で検出することも可能である。但し、回収や検出に供する前に必要に応

じて担体Iおよび担体IIを低濃度の緩衝液で洗浄してもよい。エンベロープウイルスを担体Iから分離する方法としては、塩溶液および界面活性剤あるいは両者の混合物を作用させて標的物質を標的物質吸着体から解離させる方法がある。塩溶液としては高濃度の、例えば2~8Mの臭化カリウム、臭化ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、グアニジンイソチオシアネット、グアニジンチオシアネット、塩酸グアニジン、硫酸グアニジン、チオシアノ酸ナトリウム、チオシアノ酸カリウムおよびその塩の水溶液、1.5~6M塩化ナトリウム水溶液、0.5~5Mリソタングステン酸水溶液等を用いることができる。界面活性剤としては、SDS、トライトンX-100、Tween 20、NP-40などがある。エンベロープウイルスに対するダメージが少ない方法としては、1.5~2M程度の塩化ナトリウム溶液による解離が好ましい。非エンベロープウイルスを担体IIから分離する方法としては、上記担体Iで用いた試薬類の他に、エチレンジアミン四酢酸(EGTA)、エチレングリコール(2-アミノエチルエーテル)四酢酸(EGTA)などのキレート剤も用いることができる。

【0024】

【実施例】以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。以下の記載においては、特記しない限り「部」は「重量部」を意味する。

参考例1 (担体Iの合成)

(1) 油性磁性流体フェリコロイドHC50 [商品名、タイホー工業(株)製]にアセトンを加えて粒子を析出沈殿させた後、これを乾燥することにより、親油化処理された表面を有するフェライト系の超常磁性体(粒子径: 0.01μm)を得た。ついで、上で得た超常磁性体40部にシクロヘキシルメタクリレート90部、トリメチルアミノエチルメタクリレートの塩化物10部およびベンゾイルペルオキシド(重合開始剤)3部を添加し、この系を混合攪拌することにより超常磁性体を均一に分散させてモノマー組成物を調製した。一方、ポリビニアルコール10部、ラウリル硫酸ナトリウム0.05部およびポリエチレンオキシドノニルフェニルエーテル0.1部を水1000部に溶解して水性モノマー組成物を調製した。こうして調製した水性モノマー組成物中に上記のモノマー組成物を添加し、ホモジナイザーで予備攪拌した後、超音波分散機で分散処理することにより平均粒子径が1μmの油滴(油相)が水性媒体に分散した懸濁液(油滴分散体)を調製した。次に、得られた懸濁液を容量2リットルの攪拌機付き三つ口フラスコに仕込み、この系を75°Cに昇温し、窒素雰囲気下において攪拌しながら5時間にわたり油滴中のモノマーを重合(懸濁重合)させることにより、磁性ポリマー粒子を作製した。得られた粒子を光学顕微鏡で写真撮影し、粒子200個の直径を計測してその平均を求めた結果1.2μmであつ

た。

(2) 上記(1)で得られた磁性ポリマー粒子を5mM水酸化ナトリウム水溶液に分散し、80°Cで12時間処理してカルボキシ変性磁性ポリマー粒子とした。

(3) 得られたカルボキシ変性磁性ポリマー粒子1gを20mLの10mM MES緩衝溶液(pH6.0)に懸濁し、ポリエチレンイミン(和光純薬工業株式会社、数平均分子量7万)30%水溶液、33μLおよび水溶性カルボジイミド試薬EDC・塩酸塩(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロライド)0.05gを添加し、2時間室温で反応させた後、純水手で洗浄してポリエチレンイミン結合磁性粒子を得た。

【0025】参考例2(担体IIの合成)

(1) 耐圧反応容器にスチレン35g、n-ブチルリチウム0.44gおよびシクロヘキサン200gを仕込み、60~90°Cを保ちながら4時間重合した後、反応容器内に二酸化炭素を吹き込むことにより反応を終了した。次いで減圧下で溶剤および未反応单量体を留去したのち、エーテル100gを加えて希釈し、ポリマー溶液を得た。このポリマー溶液に濃硫酸41gを少しづつ添加し、50°Cで5時間攪拌を続けた後、減圧下で溶剤を留去し、得られた生成物を水酸化ナトリウムにより中和後、透析によって精製し、末端カルボン酸変性ポリスチレンスルホン酸ナトリウム(分子量26000)を得た。

(2) 次に、参考例1の(2)で得られたの粒子10gを水50gに分散し、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(WS-C)0.1gを加え、4°Cで1時間反応後、冷水で洗浄し、次いで0.5gのヘキサメチレンジアミンを加え、室温で2時間反応後、純水で洗浄しヘキサメチレンジアミン固定化粒子を得た。これに、WS-C 0.1g、末端カルボン酸変性ポリスチレンスルホン酸0.5gを加え、室温で2時間反応した後、純水にて粒子を洗浄しポリスチレンスルホン酸結合磁性粒子を得た。

【0026】ウイルス液

ポリオウイルス(非エンベロープウイルス)と水泡性口

内炎ウイルス(エンベロープウイルス)の二種類を用いた。それぞれのウイルスを感染させたVero細胞の培養上清をウイルス液として用いた。

量子的感染性測定法

本発明のウイルス選択性分離方法により目的のウイルスが分離できているかの確認法として、培養細胞による量子的感染性測定法を用いた。96ウェルマイクロプレート上に培養したVero細胞に、3倍希釈系列のウイルス液、担体I処理液、担体II処理液を10μL添加して、37°Cで96時間培養後、細胞の破壊を観察した。培養細胞全体が破壊されているものを+、一部が破壊されているものを+/-、破壊の見られないものを-と表記した。

【0027】実施例1

Simian virus 40(SV40、エンベロープウイルス)液2mLに参考例1(担体I)の粒子を20mg加え、15分間穏やかに攪拌後、磁気分離により参考例1の粒子を除去した。続いてこの担体I処理液のうち1mLに、参考例2(担体II)の粒子10mgおよび1M硫酸亜鉛25μLを加え、15分間穏やかに攪拌後、磁気分離により参考例2の粒子を除去した。この担体III処理液および先の担体I処理液、ウイルス混合原液をそれぞれ、Vero細胞に添加して、量子的感染性測定法によるウイルス除去の評価を行った。結果を表1に示す。

実施例2

ポリオウイルス(非エンベロープウイルス)液2mLに参考例1(担体I)の粒子を20mg加え、15分間穏やかに攪拌後、磁気分離により参考例1の粒子を除去した。続いてこの担体I処理液のうち1mLに、参考例2(担体II)の粒子10mgおよび1M硫酸亜鉛25μLを加え、15分間穏やかに攪拌後、磁気分離により参考例2の粒子を除去した。この担体III処理液および先の担体I処理液、ウイルス混合原液をそれぞれ、Vero細胞に添加して、量子的感染性測定法によるウイルス除去の評価を行った。結果を表2に示す。

【0028】

【表1】

	x1	x3	x9	x27	x81	x243	x729	x2187	x6561	x19683
原液	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

I: 担体I処理液

II: 担体II処理液

【0029】

【表2】

	x1	x3	x9	x27	x81	x243	x729	x2187	x6561	x19883
原液	+	+	+	+	+	+	+	+/.	.	.
I	+	+	+	+	+	+	+	+/.	.	.
II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

I : 担体I処理液

II : 担体II処理液

【0030】

【発明の効果】本発明のエンベロープウイルスと非エンベロープウイルスの選択的分離方法では、簡便な操作でそれぞれのウイルスを分離可能である。

フロントページの続き

(72)発明者 日方 幹雄
東京都中央区築地二丁目11番24号ジェイエスアール株式会社内

(72)発明者 佐藤 功栄
茨城県猿島群綾和町大字下大野字高谷2965
-37

(72)発明者 山口 照英
東京都練馬区大泉学園町5-10-15
F ターム(参考) 4B065 AA95X BD14 BD40 CA60